

<p>2004-215840/21 D16 EI5 (D13) SUNG- 2002.08.20 SUNGENE GMBH &amp; CO KGAA *DE 10238978-A1 2002.08.20 2002-1038978(+2002DE-1038978) (2004.03.04) A01H 5/08, A23K 1/00, A23L 1/00, 1/303, C07H 21/00, C12N 9/02, 15/52, C12P 23/00 Method for preparing ketocarotenoids, useful e.g. as food or feed supplements, by increasing, or introducing, ketolase activity in the fruits of transgenic plants, also new nucleic acid constructs C2004-085423</p>	<p>D(3-G4, 3-H1E, 5-H8, 5-H12D5, 5-H12E, 5-H16B, 5-H17B3) E(3)</p> <p><u>USE</u> The modified plants with increased (II) activity are used: (i) as ornamentals; (ii) as food or animal feed; and (iii) for preparation of (I)-containing extracts or for preparing food/feed supplements (claimed), e.g., especially where (I) is astaxanthin, as a pigment for coloring trout, salmon and shrimps.</p> <p><u>ADVANTAGE</u> The transgenic plants produce fruits with increased content of (I).</p> <p><u>EXAMPLE</u> Vector pS3KETO2 comprises, in pSUN5, a cassette containing the constitutive double 35S cauliflower mosaic virus promoter; the rbcS chloroplast transit peptide; the ketolase gene from <i>Haemoccocus pluvialis</i> and a terminator. It was used to transform tomato cells, using <i>Agrobacterium tumefaciens</i>, and the infected cells regenerated to plants conventionally. One of the resulting transgenic lines, CS13-24, produced fruits that contained lycopene, <math>\beta</math>-carotene, canthaxanthin, DE 10238978-A+</p>
<p><u>NOVELTY</u> Method for preparing ketocarotenoids (I) by culturing genetically modified plants that, in comparison with the wild-type, have altered ketolase (II) activity in the fruits.</p> <p><u>DETAILED DESCRIPTION</u> INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following: (1) nucleic acid construct comprising a fruit-specific promoter linked functionally to a sequence that encodes (II); (2) genetically modified plants in which the fruits have (II) activity; and (3) method for preparing the plants of (2).</p>	

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

<p>adonirubin or astaxanthin, but the last three were absent from wild-type fruits (which additionally contained lutein, not detected in transgenic fruits).</p> <p><b>TECHNOLOGY FOCUS</b></p> <p>Biotechnology - Preferred Plants: These contain at least one nucleic acid sequence that encodes (II), especially under control of a fruit-specific promoter, and particularly they contain chromoplasts in the fruit. Especially (II) is a 329 amino acid (aa) protein (2) from <i>Haematococcus pluvialis</i> or a 258 aa protein (16) from <i>Nostoc</i> sp., or sequences derived from them by substitution, insertion or deletion, but retaining at least 20% homology at the aa level and enzymatic activity. Especially it is encoded by 1771 or 777 bp sequences. Optionally the plants also have (increased) hydroxylase activity. About 80 suitable genera are listed, e.g. <i>Ananas</i>; <i>Citrus</i>, <i>Lycopersicon</i>; <i>Ribes</i> and <i>Vitis</i>.</p> <p>Preferred Process: The (II)-encoding nucleic acid is inserted by standard methods, then the transgenic plants are cultivated, harvested and (I) isolated from their fruits.</p> <p>Preferred Carotenoids: These are astaxanthin; canthaxanthin; echinenone (or its 3- or 3'-hydroxy derivatives); adonirubin or adonixanthin.</p> <p>(77pp1251DwgNo.0/9)</p>	<p>DE 10238978-A</p>
---	----------------------

**THIS PAGE BLANK (USP 16,**



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 38 978 A1 2004.03.04

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 38 978.0

(22) Anmeldetag: 20.08.2002

(43) Offenlegungstag: 04.03.2004

(51) Int Cl.7: A01H 5/08

C12N 15/52, C12N 9/02, C12P 23/00,  
A23K 1/00, A23L 1/00, A23L 1/303,  
C07H 21/00

(71) Anmelder:

SunGene GmbH & Co. KGaA, 06466 Gatersleben,  
DE

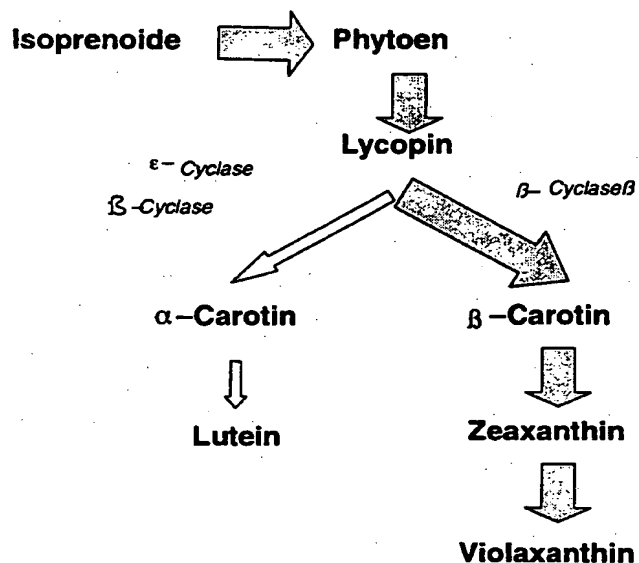
(72) Erfinder:

Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in Früchten von Pflanzen

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweisen.



## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweisen, diegenetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- oder Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

[0002] Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin oder Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

[0003] Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

[0004] Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis*, oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

[0005] Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.

[0006] WO 98/18910 beschreibt die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen eines Ketolase-Gens in Tabak.

[0007] WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaatpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promotors und einer Ketolase aus *Haematococcus*.

[0008] Die im Stand der Technik offenbarten Verfahren liefern zwar genetisch veränderte Pflanzen, die in spezifischen Geweben einen Gehalt an Ketocarotinoiden aufweisen, weisen jedoch den Nachteil auf, dass die Höhe des Gehalts an Ketocarotinoiden und die Reinheit, insbesondere an Astaxanthin, noch nicht zufriedenstellend ist.

[0009] Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein alternatives Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Pflanzen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Ketocarotinoiden, aufweisen und den geschilderten Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

[0010] Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Pflanzen kultiviert, die in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweisen.

[0011] Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

[0012] Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

[0013] Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

[0014] Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

[0015] Um in den Früchten der genetisch veränderten Pflanzen eine Ketolaseaktivität aufzuweisen, werden in einer bevorzugten Ausführungsform genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in-Früchten eine Ketolase exprimieren.

[0016] Vorzugsweise werden daher im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Früchten mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.

[0017] Es sind keine Pflanzen bekannt, die als Wildtyp in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweisen. Insbesondere weisen die nachstehend beschriebenen, bevorzugten Pflanzen in Früchten als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität auf.

[0018] In der vorliegenden Erfindung wird die Ketolase-Aktivität in Früchten der genetisch veränderten Pflanzen durch die genetische Veränderung der Ausgangspflanze verursacht. Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze weist somit, im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Ausgangspflanze eine Ketolase-Aktivität in Früchten auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, in Früchten eine Ketolase zu exprimieren.

[0019] Unter dem Begriff "Ausgangspflanze" oder "Wildtyp" wird die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze verstanden.

[0020] Unter dem Begriff "genetisch veränderte Pflanze" wird vorzugsweise eine im Vergleich zur Ausgangspflanze genetisch veränderte Pflanze verstanden.

[0021] Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze oder beides verstanden werden.

[0022] Die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, in den Früchten der Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Ausgangspflanze.

[0023] Die Erfindung betrifft daher insbesondere das vorstehend beschriebene Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, in die man ausgehend von einer Ausgangspflanze, mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, eingebracht hat.

[0024] Dazu kann prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäure die eine Ketolase kodiert, verwendet werden.

[0025] Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

[0026] Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs, zu verwenden.

[0027] Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren bzw. in den nachstehend beschriebenen erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus

*Haematoccus pluvialis*, insbesondere aus *Haematoccus pluvialis* Flotow em. Wille (Accession No. X86782; Nukleinsäure: SEQ ID No. 1, Protein SEQ ID No. 2),

*Haematoccus pluvialis*, NIES-144 (Accession No. D45881; Nukleinsäure: SEQ ID No. 3, Protein SEQ ID No. 4),

*Agrobacterium aurantiacum* (Accession No. D58420; Nukleinsäure: SEQ. ID. No. 5, Protein SEQ ID No. 6),

*Alicigenes spec.* (Accession No. D58422; Nukleinsäure: SEQ ID No. 7, Protein SEQ ID No. 8),

*Paracoccus marcusii* (Accession No. Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID No. 9, Protein SEQ ID No. 10).

*Synechocystis sp.* Strain PC6803 (Accession No. S76617, NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID No. 11, Protein SEQ ID No. 12).

*Bradyrhizobium sp.* (Accession No. AF218415, BAB 74888; Nukleinsäure: SEQ ID No. 13, Protein SEQ ID No. 14).

*Nostoc sp.* Strain PCC7120 (Accession No. AP003592; Nukleinsäure: SEQ ID No. 15, Protein SEQ ID No. 16).

[0028] Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen SEQ ID NO. 2 und/oder SEQ ID NO. 16 leicht auffinden.

[0029] Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID. No 1 und/oder SEQ ID NO. 15 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

[0030] Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

[0031] Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31–9.57 oder in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1–6.3.6 beschrieben.

[0032] Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

[0033] Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

[0034] Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

[0035] Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

- (iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder
- (iv) 6X SSC, 0,5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder
- (v) 6XSSC, 0,5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- (vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder
- (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0,1 % Rinderserumalbumin, 0,1 % Ficoll, 0,1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder
- (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder
- (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).
- (2) Waschschrirte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel
  - (i) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C, oder
  - (ii) 0,1X SSC bei 65°C, oder
  - (iii) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C, oder
  - (iv) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder
  - (v) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C, oder
  - (vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

[0036] In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

[0037] Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO. 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

[0038] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

[0039] Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO. 16 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

[0040] Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

[0041] Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

[0042] Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

[0043] Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:



## Multiple alignment parameter:

Gap penalty	10
Gap length penalty	10
Pairwise alignment parameter:	
K-tuple	1
Gap penalty	3
Window	5
Diagonals saved	5

[0044] Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 oder 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 oder 16, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

[0045] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

[0046] Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

[0047] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO. 1, in den Pflanze ein.

[0048] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO. 15, in den Pflanze ein.

[0049] Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

[0050] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

[0051] Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem fruchtspezifischen Promotor, in die Pflanze eingebracht.

[0052] Unter Pflanzen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Pflanzen verstanden, die als Wildtyp in Früchten Chromoplasten aufweisen.

[0053] Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Früchten zusätzlich Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin, Neoxanthin, Violaxanthin oder Lutein auf.

[0054] Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Früchten zusätzlich eine Hydroxylase-Aktivität auf.

[0055] Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

[0056] Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

[0057] Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

[0058] Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Canthaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

[0059] Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Lathyrus, Lonicera, Luffa, Lycium, Lycopersicum, Malpighia, Mangifera, Mormodica, Murraya, Musa, Nenga, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea, Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sabal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Symplocos, Tabernaemontana, Tamus, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vigna oder Vitis.

[0060] Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128–6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/ Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

[0061] Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, ein Ernten der Pflanzen und ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Früchten der Pflanzen angeschlossen.

[0062] Die transgenen Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

[0063] Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Früchten erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Früchten erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

[0064] Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437–440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609–618) beschrieben.

[0065] Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinonon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

[0066] Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

[0067] Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

[0068] Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

[0069] Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

[0070] Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

[0071] Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

[0072] Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693–8711).

[0073] Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdggen in Pflanzen steuern kann.

[0074] "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

[0075] Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285–294; Odell et al. (1985) Nature 313:810–812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281–288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221–228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195–2202).

[0076] Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962–4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der

TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus *Agrobacterium*, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) *Plant Mol Biol* 29:637–649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675–689; Bruce et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9692–9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolären ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), *Plant. Mol. Biol.* 36, 89–99, Hillebrand et al. (1996), *Gene*, 170, 197–200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

[0077] Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:89–108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:361–366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) *Plant J* 2:397–404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

[0078] Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogeninduzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:361–366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

[0079] Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) *Neth J Plant Pathol* 89:245–254; Uknes, et al. (1992) *The Plant Cell* 4:645–656; Van Loon (1985) *Plant Mol Biol* 4:111–116; Marineau et al. (1987) *Plant Mol Biol* 9:335–342; Matton et al. (1987) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325–342; Somssich et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2427–2430; Somssich et al. (1988) *Mol Gen Genet* 2:93–98; Chen et al. (1996) *Plant J* 10:955–966; Zhang and Sing (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2507–2511; Warner, et al. (1993) *Plant J* 3:191–201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961–968(1989).

[0080] Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) *Ann Rev Phytopath* 28:425–449; Duan et al. (1996) *Nat Biotech* 14:494–498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215:200–208), des Systemin (McGurl et al. (1992) *Science* 225:1570–1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:783–792; Ekelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323:73–76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) *The Plant J* 6(2):141–150) und dergleichen.

[0081] Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungsspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließen zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

[0082] Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Früchte und Kombinationen hieraus.

[0083] Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

[0084] Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) *EMBO J* 8:2445–2451).

[0085] Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).

[0086] Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), der glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

[0087] Fruchtspezifische Promotoren sind beispielsweise der Pds-Promoter aus Tomate (Genbank-ACCESSION U46919; Corona, V., Aracri, B., Kosturkova, G., Bartley, G.E., Pitto, L., Giorgetti, L., Scolnik, P.A. and Giuliano, G., Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development *Plant J.* 9 (4), 505–512 (1996)), SEQ ID NO.17,

der 2A11 Promoter aus Tomate (Pear, J.R., Ridge, N., Rasmussen, R., Rose, R.E. and Houck, C.M. Isolation and characterization of a fruit-specific cDNA and the corresponding genomic clone from tomato *Plant Mol. Biol.* 13 (6), 639–651 (1989), SEQ ID NO. 18,

der Cucumisin Promoter (Yamagata, H., Yonesu, K., Hirata, A. and Aizono, Y., TGTCACA Motif Is a Novel cis-Regulatory Enhancer Element Involved in Fruit-specific Expression of the cucumisin Gene *J. Biol. Chem.*

277 (13), 11582–11590 (2002), SEQ ID NO. 19,

der Promoter des Endogalacturonasegens (Redondo-Navado, J., Medina-Escobar, N., Caballero-Repullo, J.L. and Munoz-Blanco, J.

A fruit-specific and developmentally regulated endo-polygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* c.v. Chandler), J Experimental Botany 52 (362) 1941–1945 (2001), SEQ ID NO. 20,

der Polygalacturonase Promoter aus Tomate (Nicholass, F.J., Smith, C.J., Schuch, W., Bird, C.R. and Grierson, D., High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions, Plant Mol. Biol. 28 (3), 423–435 (1995)), SEQ ID NO. 21,

die TMF7 und TMF9 Promotoren (US 5608150),

der Promotor E4 (Cordes S. Deikman J. Margossian L.J. Fischer R.L. Interaction of a developmentally regulated DNA-binding factor with sites flanking two different fruit-ripening genes from tomato (1989), Plant Cell 1, 1025–1034) und

der Promotor E8 (Deikman and Fisher, Interaction of a DNA binding factor with the 5'-flanking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato (1988), EMBO J. 7, 3315–3320). Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben (Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253–277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1–11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402–8406).

[0088] Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Früchten der erfindungsgemäßen Pflanzen.

[0089] Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive sowie insbesondere fruchtspezifische Promotoren.

[0090] Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen fruchtspezifischen Promotor, besonders bevorzugt einen oben beschriebenen fruchtspezifischen Promotor, und eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

[0091] Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

[0092] Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren, kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

[0093] Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

[0094] Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

[0095] Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Kodon in der NcoI Schnittstelle:

#### pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCTCCGCGCCGCGCCGCGCGCTCG  
TAAGGTCACCGCGGATTCTGTCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGA  
TCC\_BamHI

#### pTP10

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCTCCGCGCCGCGCCGCGCGCTCG

TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGCTG  
GATCC\_BamHI

pTP11

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTG  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCCCTCCGCCGCCGCCGCCGCTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGGGG  
ATCC\_BamHI

[0096] Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

[0097] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

[0098] Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

[0099] Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

[0100] Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

[0101] Ein Beispiel für einen Terminator ist der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

[0102] Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

[0103] Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewingback" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

[0104] Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

[0105] Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

[0106] Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

[0107] Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993),

128–143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205–225) beschrieben.

[0108] Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

[0109] Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

[0110] Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden.

[0111] Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

[0112] Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase enthalten.

[0113] Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71–119 (1993) beschrieben.

[0114] Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184, pMC1210, pMcl 210 und pCL1920. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

[0115] Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv oder vorzugsweise spezifisch in den Früchten erfolgen.

[0116] Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen fruchtspezifischen Promotor und Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in das Genom der Ausgangspflanze einführt.

[0117] Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zur Ausgangspflanze in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweist.

[0118] Die Ketolaseaktivität wird in einer bevorzugten Ausführungsform dadurch erreicht, dass die genetisch veränderte Pflanze in den Früchten eine Ketolase exprimiert.

[0119] Die bevorzugten, genetisch veränderten Pflanzen enthalten daher in Früchten mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

[0120] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in die Ausgangspflanze.

[0121] Der Erfindung betrifft daher besonders bevorzugt eine vorstehend beschriebene genetisch veränderte Pflanze, dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze ausgehend von einer Ausgangspflanze mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase eingebracht hat.

[0122] Die Erfindung betrifft insbesondere genetisch veränderte Pflanzen, ausgewählt aus den Pflanzengattungen *Actinophloeus*, *Aglaeonema*, *Ananas*, *Arbutus*, *Archontophoenix*, *Area*, *Aronia*, *Asparagus*, *Attalea*, *Berberis*, *Bixia*, *Brachychilum*, *Bryonia*, *Caliptocalix*, *Capsicum*, *Carica*, *Celastrus*, *Citrullus*, *Citrus*, *Convallaria*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cuscuta*, *Cycas*, *Cyphomandra*, *Dioscorea*, *Diospyrus*, *Dura*, *Elaeagnus*, *Elaeis*, *Erythroxylon*, *Euonymus*, *Ficus*, *Fortunella*, *Fragaria*, *Gardinia*, *Gonocaryum*, *Gossypium*, *Guava*, *Guilielma*, *Hibiscus*, *Hippophaea*, *Iris*, *Lathyrus*, *Lonicera*, *Luffa*, *Lycium*, *Lycopersicum*, *Malpighia*, *Mangifera*, *Mormodica*, *Murraya*, *Musa*, *Nenga*, *Palisota*, *Pandanus*, *Passiflora*, *Persea*, *Physalis*, *Prunus*, *Ptychandra*, *Punica*, *Pyraecantha*, *Pyrus*, *Ribes*, *Rosa*, *Rubus*, *Sabal*, *Sambucus*, *Seaforita*, *Shepherdia*, *Solanum*, *Sorbus*, *Synspadix*, *Tabernae*, *Tamus*, *Taxus*, *Trichosanthes*, *Triphasia*, *Vaccinium*, *Viburnum*, *Vignia* oder *Vitis*, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

[0123] Ganz besonders bevorzugte Pflanzengattungen sind *Ananas*, *Asparagus*, *Capsicum*, *Citrus*, *Cucumis*,

Cucurbita, Citrullus, Lycopersicum, Passiflora, Prunus, Physalis, Solanum, Vaccinium und Vitis, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

[0124] Wie vorstehend erwähnt wird in bevorzugten transgenen Pflanzen die Ketolase in den Früchten exprimiert, besonderes bevorzugt ist die Expression der Ketolase in den Früchten am höchsten.

[0125] Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Früchte sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0126] Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, verwendet werden.

[0127] Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Ferner können die genetisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten der Pflanzen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

[0128] Die genetisch veränderten Pflanzen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

[0129] Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

[0130] Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

[0131] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

[0132] Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall insbesondere ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

[0133] Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Experimentelle Bedingungen: Sequenzanalyse rekombinanter DNA

[0134] Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel 1: Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille kodiert

[0135] Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* kodiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

[0136] Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus* Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.02  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l  $FeSO_4 \cdot H_2O$ ) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (Life Technologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

[0137] Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID No. 29) in cDNA umgeschrieben.

[0138] Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID No. 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID No. 29) amplifiziert.

[0139] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR1 (SEQ ID No. 29)

- 0,2 mM PR2 (SEQ ID No. 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25,8 µl Aq. Dest.

[0140] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	2 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

[0141] Die PCR-Amplifikation mit SEQ 29 No. 29 und SEQ ID No. 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

[0142] Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Kodons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (**Abb. 3 und 4**, Sequenzvergleiche).

[0143] Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SpHI-Fragmentes aus pGKETO2 und Ligierung in den SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der das *Haematococcus pluvialis* Ketolasegen in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit der rbcS Transitpeptidsequenz enthält, heißt pJKETO2.

Beispiel 2: Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus kodiert

[0144] Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus kodiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

[0145] Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

[0146] Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

[0147] Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID No. 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID No. 29) amplifiziert.

[0148] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR1 (SEQ ID No. 29)
- 0,2 mM PR3 (SEQ ID No. 31)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25,8 µl Aq. Dest.

[0149] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:



1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	2 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

[0150] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 29 und SEQ ID No. 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein kodiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2–16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

[0151] Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO3 erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID No. 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1-53) der SEQ ID No. 22 im Amplifikat SEQ ID No. 24 durch eine in der Sequenz abweichende Nonamersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0152] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SphI Fragmentes aus pGKETO3 und Ligierung mit dem SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Haematococcus pluvialis Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO3.

Beispiel 3: Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus Haematococcus pluvialis Flotow em. Wille (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert

[0153] Die cDNA, die für die Ketolase aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers PR15 (SEQ ID No. 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezifischen 3'Region (Nucleotide 40–59) und einer myc-Tag kodierenden 5'Region (Nucleotide 1-39).

[0154] Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11,5 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µg pGKETO2 PlasmidDNA
- 0,1 µg PR15 (SEQ ID No. 32)

[0155] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 11,5 µl pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0156] Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus Haematococcus pluvialis unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID No. 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR15 SEQ ID No. 32) amplifiziert.

[0157] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR15 (SEQ ID No. 32)
- 0,2 µM PR2 (SEQ ID No. 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0158] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0159] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein kodiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem *rbcS* Transitpeptid am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

[0160] Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO4 erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID No. 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993-1155) der SEQ ID No. 22 im Amplifikat SEQ ID No. 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0161] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGKETO4 und Ligation mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der *rbcS* Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem *rbcS* Transitpeptid enthält, heißt pJKET4.

Beispiel 4: Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Lycopersicon esculentum*

[0162] Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285–294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709–715).

[0163] Die Herstellung eines Expressionsplasmides für die Agrobacteriumvermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (W002/00900).

– Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (**Abb. 5**, Konstruktkarte). In der **Abb. 5** beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

– Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO3 wurde das 2.7 Kb bp SacI-XhoI Fragment aus pJKETO3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (**Abb. 6**, Konstruktkarte). In der **Abb. 6** beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO3 (985 bp) die um 14 N-terminale Aminosäuren verkürzte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

[0164] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO4 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO4 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (**Abb. 7**, Konstruktkarte). In der **Abb. 7** beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter ((747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO4 (1038 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit C-terminalem myc-Tag, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 5: Herstellung von Expressionsvektoren zur Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Lycopersicon esculentum*

[0165] Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709–715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711–1721).

[0166] Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion –902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID No. 33) und PR10 (SEQ ID No. 36) hergestellt.

[0167] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 33)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0168] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0169] Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.

[0170] Sequenzierung des Klon pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

[0171] Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200-9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID No. 33) und Primern PR9 (SEQ ID No. 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526-9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID No. 34) und PR10 (SEQ ID No. 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

[0172] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID No. 33 bzw. PR8 SEQ ID No. 35)
- 0,2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID No. 35 bzw. PR10 SEQ ID No. 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0173] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0174] Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670-9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17,6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0,5 µg A7/9 Amplifikat
- 0,25 µg A8/10 Amplifikat

[0175] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten

war:

- 17,6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0176] Die Nukleinsäure, kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P, wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID No. 28) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID No. 36) amplifiziert.

[0177] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 33)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0178] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
-1X	72°C	10 Minuten

[0179] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 33 und SEQ ID No. 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pTAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285-9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0180] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJAP3P.

[0181] Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJAP3PKETO2.

[0182] Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJAP3PKETO4.

[0183] Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacteriumvermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Haematococcus pluvialis in L. esculentum erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (W002/00900).

– Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (**Abb. 8**, Konstruktkarte). In der **Abb. 8** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Haematococcus pluvialis Ketolase, Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

– Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO4 wurde das 2.8 KB SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO4 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (**Abb. 9**, Konstruktkarte). In der **Abb. 9** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO4 (1038 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Haematococcus pluvialis Ketolase mit C-terminalem myc-Tag, Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 6: Herstellung transgener *Lycopersicon esculentum* Pflanzen

[0184] Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen erfolgte nach der publizierten Methode von Ling und Mitarbeitern (Plant Cell Reports (1998), 17:843–847). Für die Varietät Microtom wurde mit höherer Kanamycin-Konzentration (100mg/L) selektioniert.

[0185] Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienten Kotyledonen und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wurde das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962: Murashige and Skoog, 1962, Physiol. Plant 15, 473-) mit 2 % Saccharose, pH 6,1 verwendet. Die Keimung fand bei 21°C bei wenig Licht (20 bis 100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Kotyledonen quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5 bis 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3 % Saccharose + 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tabakzellen beschickt wurde. Die Tabakzellen wurden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgte für drei bis fünf Tage. Zellen des Stammes Agrobacterium tumefaciens LBA4404 wurden einzeln mit den Plasmiden pS3KETO2, pS3KETO3 bzw. pS3AP3KETO2 transformiert. Von den einzelnen mit den Binaervektoren pS3KETO2, pS3KETO3 bzw. pS3KETO2 transformierten Agrobakterium-Stämmen wurde jeweils eine Übernachtskultur in YEB Medium mit Kanamycin (20 mg/l) bei 28 Grad Celsius kultiviert und die Zellen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem MS Medium (3 % Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt. Die vorkultivierten Explantate wurden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit sterilem Filterpapier getrocknet und für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.

[0186] Nach der Co-kultur wurden die Explantate auf MS22 Medium (MS pH 6,1 + 3 % Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 bis 100 µE, Lichtrythmus 16 h / 8 h) aufbewahrt. Aller zwei bis drei Wochen erfolgte der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bildeten. Kleine Sprosse konnten vom Explantat abgetrennt werden und auf MS (pH 6,1 + 3 % Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin, 0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen wurden ins Gewächshaus überführt.

[0187] Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten: Mit pS3KETO2 wurde erhalten: cs13-24, cs13-30, cs13-40.

[0188] Mit pS3KETO3 wurde erhalten: cs14-2, cs14-3, cs14-9, cs14-19.

[0189] Mit pS3AP3KETO2 wurde erhalten: cs16-15, cs16-34, cs16-35, cs16-40.

## Beispiel 8: Charakterisierung der transgenen Früchte

[0190] Das Fruchtmaterial der transgenen Pflanzen wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 µl). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 µl Aceton resuspendiert.

[0191] Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnte zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551–558).

[0192] Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der W-VIS-Spektren möglich.

[0193] Tabelle 1 zeigt das Carotinoidprofil in Tomatenfrüchten der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tomaten und Kontrolltomatenpflanzen. Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze weisen die genetisch veränderten Pflanzen einen Gehalt an Ketocarotinoiden und insbesondere einen Gehalt an Astaxanthin auf.

Tabelle 1

Pflanze	Lutein	Lycopin	beta-Carotin	Cryptoxanthin	Canthaxanthin	Adonirubin	Astaxanthin
Kontrolle	+	+	+	(+)	-	-	-
Kontrolle	+	+	+	(+)	-	-	-
CS13-24	-	+	+	(+)	+	+	+
CS13-30	-	+	+	(+)	+	+	+
CS13-40	-	+	+	(+)	+	+	+
CS14-2	-	+	+	(+)	+	+	+
CS14-3	-	+	+	-	+	+	+
CS14-9	-	+	+	(+)	+	+	+
CS14-19	-	+	+	-	+	+	+
CS16-15	-	+	+	(+)	+	+	+
CS16-34	-	+	+	(+)	+	+	+
CS16-35	-	+	+	-	+	+	+
CS16-40	-	+	(+)	(+)	+	+	+

+ bedeutet Carotinoid nachweisbar

- bedeutet Carotinoid nicht detektiert

(+) bedeutet Carotinoidkonzentration an der Nachweisgrenze



## DE 102 38 978 A1 2004.03.04

Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser	
105 110 115	
ctg ctc gac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca	561
Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr	
120 125 130	
ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg	609
Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met	
135 140 145	
aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg	657
Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu	
150 155 160	
tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac	705
Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His	
165 170 175 180	
cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga	753
His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly	
185 190 195	
aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg	801
Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met	
200 205 210	
tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag	849
Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln	
215 220 225	
ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg	897
Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala	
230 235 240	
ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc	945
Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro	
245 250 255 260	
cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg	993
His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met	
265 270 275	
aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt	1041
Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe	
280 285 290	
ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc	1089
Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro	
295 300 305	
ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga	1137
Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg	
310 315 320	
ggg ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca	1185
Gly Leu Val Pro Ala	



325

gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg 1245  
 gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg tttgtagctg 1305  
 tcgagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtggtgcagg gagtacaccc acaggccaac 1365  
 acccttgtag gagatgtctt gcgtcgggag gagtgttggg cagtgtagat gctatgattg 1425  
 tatcttaatg ctgaagcctt taggggagcg acacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc 1485  
 aaggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcgggtg caggcagggtg aagaggtgcg 1545  
 ggaggggtgt gccacacca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg 1605  
 agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcacttat tctttgatat 1665  
 agatactggt caggcagggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 1725  
 ccctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tggttcaaaa aaaaaa 1771

<210> 2  
 <211> 329  
 <212> PRT  
 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 2

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110

DE 102 38 978 A1 2004.03.04

Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
325

<210> 3  
 <211> 1662  
 <212> DNA  
 <213> Haematococcus pluvialis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (168)..(1130)  
 <223>

<400> 3  
 cggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga 60  
 gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg 120  
 ctccgtcctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc 176  
 Met His Val  
 1  
 gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc 224  
 Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser  
 5 10 15  
 agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc 272  
 Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser  
 20 25 30 35  
 gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct 320  
 Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro  
 40 45 50  
 cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc 368  
 Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly  
 55 60 65  
 acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg 416  
 Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro  
 70 75 80  
 aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc 464  
 Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala  
 85 90 95  
 cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc 512  
 Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe  
 100 105 110 115  
 att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac 560  
 Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp  
 120 125 130  
 gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc 608  
 Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu  
 135 140 145  
 ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg 656

Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met	
150 155 160	
ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg	704
Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly	
165 170 175	
aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc	752
Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe	
180 185 190 195	
gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg	800
Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu	
200 205 210	
gca tgg tgg gca gtg gtg atg caa atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat	848
Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn	
215 220 225	
ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc	896
Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu	
230 235 240	
ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca	944
Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala	
245 250 255	
gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca	992
Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala	
260 265 270 275	
tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg	1040
Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp	
280 285 290	
gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc	1088
Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys	
295 300 305	
cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga	1130
Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala	
310 315 320	
cctggtccct ccgctggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgctac aggggtgctgc	1190
ggccagtggc agcgcagtgc actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccactgagca	1250
ctgggcatgc cactgagcac tgggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg	1310
ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggctagga tggagtttga	1370
tgcattcagt agcgggtggc aacgtcatgt ggatgggtgga agtgctgagg ggtttaggca	1430
gccggcattt gagagggcta agttataaat cgcattgctgc tcatgcgcac atatctgcac	1490
acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattgggt tcgtgctatt	1550

gttttattca gcagcagtag ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgagag tggagttagt 1610

gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct 1662

<210> 4

<211> 320

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 4

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala  
1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His  
20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala  
35 40 45

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
50 55 60

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
65 70 75 80

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
85 90 95

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
100 105 110

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
115 120 125

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu  
130 135 140

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
145 150 155 160

Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly  
165 170 175

Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val

180

185

190

Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe  
 195 200 205

Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro  
 210 215 220

Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala  
 225 230 235 240

Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro  
 245 250 255

Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr  
 260 265 270

Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp  
 275 280 285

Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu  
 290 295 300

Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
 305 310 315 320

<210> 5  
 <211> 729  
 <212> DNA  
 <213> Agrobacterium aurantiacum

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(729)  
 <223>

<400> 5  
 atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg 48  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96  
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30

gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca 144  
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala

35	40	45	
aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala 50 55 60			192
cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn 65 70 75 80			240
gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp 85 90 95			288
cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr 100 105 110			336
gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala 115 120 125			384
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro 130 135 140			432
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr 145 150 155 160			480
gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe 165 170 175			528
gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro 180 185 190			576
gac cgc cac aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac ccc gtg tcg ctg Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu 195 200 205			624
ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His 210 215 220			672
ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp 225 230 235 240			720
acc gca tga Thr Ala			729

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 242

<212> PRT  
 <213> Agrobacterium aurantiacum

<400> 6

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
 35 40 45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
 180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205



Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala

<210> 7  
 <211> 1631  
 <212> DNA  
 <213> Alcaligenes sp.

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (99)..(827)  
 <223>

<400> 7  
 ctgcaggccg ggccccgttg ccaatggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60  
 ccggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116  
 Met Ser Gly Arg Lys Pro  
 1 5  
 ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164  
 Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile  
 10 15 20  
 ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212  
 Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp  
 25 30 35  
 gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260  
 Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr  
 40 45 50  
 tgg ctg tgc gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308  
 Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly  
 55 60 65 70  
 tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg 356  
 Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu  
 75 80 85  
 gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tgc tgg ccc aag ctg atc gcc aag 404  
 Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys  
 90 95 100  
 cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc 452  
 His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe  
 105 110 115

ggt cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat	500
Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr	
120 125 130	
ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat	548
Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr	
135 140 145 150	
gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc	596
Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr Val Ile Phe Trp Pro Val	
155 160 165	
ccg gcc gtt ctg gcg tcg atc cag att ttc gtc ttc gga act tgg ctg	644
Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu	
170 175 180	
ccc cac cgc ccg gga cat gac gat ttt ccc gac ccg cac aac gcg agg	692
Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg	
185 190 195	
tcg acc ggc atc ggc gac ccg ttg tca cta ctg acc tgc ttc cat ttc	740
Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe	
200 205 210	
ggc ggc tat cac cac gaa cat cac ctg cat ccg cat gtg ccg tgg tgg	788
Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro His Val Pro Trp Trp	
215 220 225 230	
cgc ctg cct cgt aca cgc aag acc gga ggc cgc gca tga cgcaattcct	837
Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly Arg Ala	
235 240	
cattgtcgtg gcgacagtcc tcgtgatgga gctgaccgcc tattccgtcc accgctggat	897
tatgcacggc cccctaggct ggggctggca caagtcccat cacgaagagc acgaccacgc	957
ggtggagaag aacgacctct acggcgctcgt cttcgcggtg ctggcgacga tcctcttcac	1017
cgtgggcgcc tattggtggc cgggtgctgtg gtggatcgcc ctgggcatga cgggtctatgg	1077
gttgatctat ttcacacctgc acgacgggct tgtgcatcaa cgctggccgt ttcgggtatat	1137
tccgcggcgg ggctatttcc gcaggctcta ccaagctcat cgctgcacc acgcggtcga	1197
ggggcgggac cactgcgta gcttcggctt catctatgcc ccaccgtgg acaagctgaa	1257
gcaggatctg aagcggtcgg gtgtcctgcg ccccaggac gagcgtccgt cgtgatctct	1317
gatcccggcg tggccgcatg aaatccgacg tgctgctggc aggggcccgc cttgccaacg	1377
gactgatcgc gctggcgatc cgcaaggcgc ggcccgaact tcgctgctg ctgctggacc	1437
gtgcggcggg cgctcggac gggcatactt ggtcctgcca cgacaccgat ttggcgccgc	1497
actggctgga ccgcctgaag ccgatcaggc gtggcgactg gcccgatcag gaggtgcggt	1557

tcccagacca ttgcgaagg ctccggggccg gatatggctc gatcgacggg cgggggctga 1617

tgcggtgcggt gacc 1631

<210> 8

<211> 242

<212> PRT

<213> Alcaligenes sp.

<400> 8

Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu  
1 5 10 15

Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe  
20 25 30

Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu  
35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly  
115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe  
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro

180

185

190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu  
 195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly  
 225 230 235 240

Arg Ala

<210> 9  
 <211> 729  
 <212> DNA  
 <213> Paracoccus marcusii

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(729)  
 <223>

<400> 9  
 atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg 48  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15  
 atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gca tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96  
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30  
 gcg ctg tgg ttt ctg gac gcg gcg gcc cat ccc atc ctg gcg gtc gcg 144  
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
 35 40 45  
 aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192  
 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60  
 cat gac gcg atg cac ggg tcg gtc gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat 240  
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80  
 gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288  
 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95  
 cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336  
 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr

100	105	110	
gac gac gac cca gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala 115 120 125			384
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro 130 135 140			432
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctg ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr 145 150 155 160			480
gtg gtc ttc tgg ccg ttg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe 165 170 175			528
gtg ttc ggc act tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro 180 185 190			576
gac cgc cat aat gcg ccg tcg tcg ccg atc agc gac cct gtg tcg ctg Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu 195 200 205			624
ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His 210 215 220			672
ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp 225 230 235 240			720
acc gca tga Thr Ala			729

<210> 10  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> *Paracoccus marcusii*

<400> 10

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
 35 40 45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

Thr Ala

<210> 11

<211> 1629

<212> DNA

<213> Synechococcus sp.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1629)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 11

atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta	48
Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu	
1 5 10 15	
gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta	96
Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu	
20 25 30	
gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg	144
Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met	
35 40 45	
ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac	192
Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His	
50 55 60	
gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag	240
Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln	
65 70 75 80	
tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg	288
Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly	
85 90 95	
ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt	336
Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys	
100 105 110	
gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat ccg caa	384
Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln	
115 120 125	
ttt gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt	432
Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe	
130 135 140	
aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg	480
Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp	
145 150 155 160	
gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg	528
Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala	
165 170 175	
ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat	576
Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn	
180 185 190	
gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt	624

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys	
195 200 205	
tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg	672
Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met	
210 215 220	
atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga	720
Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly	
225 230 235 240	
ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa	768
Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln	
245 250 255	
ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa	816
Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu	
260 265 270	
aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac cgg	864
Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg	
275 280 285	
gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg	912
Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu	
290 295 300	
caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg	960
Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly	
305 310 315 320	
gaa cga ctg gaa cgg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa	1008
Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys	
325 330 335	
atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg	1056
Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly	
340 345 350	
ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat	1104
Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His	
355 360 365	
gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct	1152
Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala	
370 375 380	
aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg	1200
Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met	
385 390 395 400	
gcc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttt gcc ccc tac	1248
Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr	
405 410 415	
cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg ggc aca ggt tgg acc	1296
Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr	



420

425

430

gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg 1344  
 Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr  
 435 440 445

gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa 1392  
 Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu  
 450 455 460

agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc 1440  
 Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val  
 465 470 475 480

tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta 1488  
 Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
 485 490 495

ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca 1536  
 Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
 500 505 510

ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga 1584  
 Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
 515 520 525

aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa 1629  
 Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
 530 535 540

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 542

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Synechococcus sp.

&lt;400&gt; 12

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
 1 5 10 15

Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
 20 25 30

Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
 35 40 45

Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His  
 50 55 60

Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln  
 65 70 75 80

Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly  
                             85                            90                            95

Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys  
                             100                            105                            110

Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln  
                             115                            120                            125

Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe  
                             130                            135                            140

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp  
                             145                            150                            155                            160

Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala  
                             165                            170                            175

Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn  
                             180                            185                            190

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys  
                             195                            200                            205

Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met  
                             210                            215                            220

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly  
                             225                            230                            235                            240

Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln  
                             245                            250                            255

Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu  
                             260                            265                            270

Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg  
                             275                            280                            285

Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu  
                             290                            295                            300

Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly  
 305 310 315 320

Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys  
 325 330 335

Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly  
 340 345 350

Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His  
 355 360 365

Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala  
 370 375 380

Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met  
 385 390 395 400

Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr  
 405 410 415

Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr  
 420 425 430

Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr  
 435 440 445

Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu  
 450 455 460

Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val  
 465 470 475 480

Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
 485 490 495

Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
 500 505 510

Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
 515 520 525

Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp

530

535

540

<210> 13  
 <211> 776  
 <212> DNA  
 <213> Bradyrhizobium sp.

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(774)  
 <223>

<400> 13  
 atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc 48  
 Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg  
 1 5 10 15  
 gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc 96  
 Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
 20 25 30  
 atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg 144  
 Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
 35 40 45  
 ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag 192  
 Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
 50 55 60  
 acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac 240  
 Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
 65 70 75 80  
 ggc tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag 288  
 Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
 85 90 95  
 ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc 336  
 Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
 100 105 110  
 gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat 384  
 Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt 432  
 Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe  
 130 135 140  
 ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc 480  
 Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val  
 145 150 155 160  
 tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg 528  
 Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu

165

170

175

ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tgc gcg ctg cag ctg ttc acc 576  
 Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr  
                   180                                  185                                  190

ttc ggc acc tat ctg ccg cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat 624  
 Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp  
                   195                                  200                                  205

cgc cac aac gcg cgg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tgc ctg ctg 672  
 Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu  
                   210                                  215                                  220

acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat 720  
 Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp  
                   225                                  230                                  235                                  240

gcg ccg tgg tgg cgg ctg ccg gag atc aag ccg ccg gcc ctg gaa agg 768  
 Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg  
                                   245                                  250                                  255

cggt gac ta 776  
 Arg Asp

<210> 14  
 <211> 258  
 <212> PRT  
 <213> Bradyrhizobium sp.

<400> 14

Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg  
 1                                  5                                  10                                  15

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
                   20                                  25                                  30

Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
                   35                                  40                                  45

Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
                   50                                  55                                  60

Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
                   65                                  70                                  75                                  80

Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
                                   85                                  90                                  95

Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
 100 105 110

Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
 115 120 125

Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe  
 130 135 140

Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val  
 145 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu  
 165 170 175

Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr  
 180 185 190

Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp  
 195 200 205

Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu  
 210 215 220

Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp  
 225 230 235 240

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg  
 245 250 255

Arg Asp

<210> 15  
 <211> 777  
 <212> DNA  
 <213> Nostoc sp.

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(777)  
 <223>

<400> 15

atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta	48
Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu	
1 5 10 15	
ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt	96
Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe	
20 25 30	
att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta	144
Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu	
35 40 45	
ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc	192
Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala	
50 55 60	
atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat	240
Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His	
65 70 75 80	
gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat	288
Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn	
85 90 95	
ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa	336
Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys	
100 105 110	
gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat	384
Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp	
115 120 125	
tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg	432
Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp	
130 135 140	
tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga	480
Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly	
145 150 155 160	
tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa	528
Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu	
165 170 175	
aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta	576
Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val	
180 185 190	
caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt	624
Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly	
195 200 205	
ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt	672
Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe	
210 215 220	
tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac	720

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240

gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata 768  
 Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
 245 250 255

tct tta taa 777  
 Ser Leu

<210> 16  
 <211> 258  
 <212> PRT  
 <213> Nostoc sp.

<400> 16

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
 20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
 35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
 50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 65 70 75 80

Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
 85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
 100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
 115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
 130 135 140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
 145 150 155 160



Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
 165 170 175

Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
 195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
 210 215 220

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
 245 250 255

Ser Leu

<210> 17  
 <211> 2093  
 <212> DNA  
 <213> Tomate

<220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(2093)  
 <223>

<400> 17  
 ttgcccagta ttacaacagc ttatatgttg agcaggtaaa agcttcaatg ccctattcctt 60  
 tctacagtta tcaatgttgc tcgtctaata tctgggtgttc ttctcgaaat gtcaattggc 120  
 ttgcagcaca ttgtcctcta atatccattc aagcttctta gatgatgaaa catttgtcaa 180  
 atttattaat ttcatagtgt tcagttctcaa ttcttttagct ggttctcat agtaaagttg 240  
 tctaatatga aatgaaaatg ttctgtgtgt tgtactaata ctttttcatg gttgtctata 300  
 gaacgtcgat gaagagccaa acagaaacta ttttgggctg cgattttctga taccattgta 360  
 tctgaatgct ggggtgggagc tcatcagaag ctttacaatg ggtcacatat atggagccgg 420  
 tatgaggaat gctgggaatc agttgcgttt cgcgtgctag gacttttctt tcttggtatt 480

tctgcccaca gccagttga ttacgtgaac tccgtcagac ttggaaagga gagaagtacc	540
caaatgtcgt ctttttagaa atacttttgt cacaaaatag cgggggtttac agctacagaa	600
gatcatgcag aaggcgtcca gtttagtttt tgaaggttgt ttggagttta tttatctaaa	660
gtaaaacttaa atcagctttt tgtttatgag ttcagtgaac tataatgttca aataagactt	720
ccctttgtag atatgtgttt tttttgttgt tgagcacttt gtgtgcattg gataaacccc	780
caacgtgtaa tagctaccat acaagagaag taactcgac tgtccatgtc ttatgtggct	840
cgactcagaa agcattcagg gggattgata accaccctcc aaaccaactg aaccattgtg	900
aataaccacc cttcaaata accgagtcct cgtgaaggac aaatatgtgg ttttatatac	960
attaaatttt gtttttacat gcttcctctt acttcttttag ttttcttgac catatcttgc	1020
gtttttccct tctgtaattg acacttttct tcaaaccatc cagcaatgtg gaagcttgac	1080
gattttcctt cagagtagaa attgaaaaga atcaactaaa aaggatagtc cttcgatttg	1140
atttccggct taaaaataaa ctaataagaa tgagagagcg aataatagaa tattttgaaa	1200
ttttaaagat attcaactat gttaaattgc gttataaatt tcttaaatta gtagcaccta	1260
atagtttagt tctcaaaagt caaaactact acataatgtg ctcatTTTTc acattaaaat	1320
gcctacatga tgtaaaagta aaactcgtag cattctacgt gttttactca actcaaacat	1380
cctgttcatt ttaataaacg tacgatgagc ttctctctcc aattttcttt tctttttttt	1440
ttttaaaaaa atattttttt ttatatcaat ccaaattggc tccaatttat cataaattag	1500
gtagaaactt agatattaaa gaaagaaaag ggtttatctc gcaagtgtgg ctatgggtggg	1560
acgtgtcaaa ttttggattg tagccaaaca tgagatttga tttaaaggga attggccaaa	1620
tcaccgaaag caggcatctt catcataaat tagtttgttt atttatacag aattatacgc	1680
ttttactagt tatagcattc ggtatctttt tctgggtaac tgccaaacca ccacaaattt	1740
caagtttcca ttttaactctt caacttcaac ccaaccaaatttatttgctt aattgtgcag	1800
aaccactccc tatatcttct aggtgctttc attcgttccg aggttaagaaa agatttttgt	1860
ttctttgaat gctttatgcc actcgtttta cttctgaggt ttgtggatct tttaggcgac	1920
tttttttttt tttgtatgta aaatttgttt cataaatgct tctcaacata aatcttgaca	1980
aagagaagga attttaccaa gtatttaggt tcagaaatgg ataattttct tactgtgaaa	2040
tatccttatg gcaggtttta ctgttatttt tcagtaaaat gcctcaaatt gga	2093

<211> 4760  
 <212> DNA  
 <213> Tomate

<220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(4760)  
 <223>

<400> 18  
 tctagattga aataaacctt attgcattta gtatatgaga atgcatctat aaaataatgt 60  
 ctatTTTTtg tggaatat ttgtgcgcca aagcacggtt tgtatTTTat attttacaat 120  
 atttttgcac ggtaatatag ttgcaagggt ttacaaacga attatctctt gaactttaaa 180  
 ttaagttcac agttttattcc aaaaataatg ttcaacttct aatcatatct cccctattg 240  
 ctagaaaaat ataacattta cgcccaactt catttaggat ccattTTTat gcatgggtgga 300  
 gcaattggat catatactac atattTTTTT aaaaaaata gatagaaatt atttaatctt 360  
 gattccgaat caattgtgat gggaaaacct tattagtttg atgtgtacat ataatgtttt 420  
 atgtcaaata aattttattt atactaaatt ttatttgaaa gtattTTTct cataacaaat 480  
 aatttaacta tattggagac atgaaaattc tacaaaacca acttgcatta tcaacataat 540  
 tttatagttt gaaattgtgc tcttaattaa acaattcaag ataacaatct ggtaaaatta 600  
 aaattacaag ttgataacaa acatatacat atgtacatct catagatgca ttcattaaat 660  
 catataatag taaatgcttc acaatagaag ggtctatatt cattTTTTT ttatgtgtca 720  
 aacaattttg aggaattcaa tttcatcttt aactggtaca ataatcattt tatcatgaaa 780  
 ataagcagct caagagaatt tttgaagaat cttttatttc tttaacattt aaccacatga 840  
 atttttaatt tttttttgca atacatttaa accgaaatgg tcaaacgatc aaccaactga 900  
 tctttattct aataaacttc tagtttacat ttgcatgtga gtgcatcatc attatcatat 960  
 ttgtacacaa caaacaagaa aaaaatataa acaatatttt atttaaatat ttatattcca 1020  
 ctttgactgt agatattaaa tcttgatcatc atttatagtc tcaatattat aattTTTTta 1080  
 ttttttcaa attcaaaagt ttacaattat ttttttgaa tataatatta tccaagatga 1140  
 acatctcaag aagaaaatta ttaatattgt tatgggttaa attttacata caatacttgt 1200  
 tttttgcttt acttttatct taccgtagat acacaatcga cgataactta gtgatcacac 1260  
 aataataatt attttgttca tgacacaata ttataagaa atacttattt ctttctttta 1320  
 tccttcagta gttcataata aaaacatacc ataatatttg tgatgcattc atagtacgta 1380

atgaaatgac aatttatgtc aaattatttt cttttatact ctcaaacctc ccgtaaaggt	1440
gagatgagtc atttatccaa ttatacataa atatgtcttt attcatgctc tttatcacat	1500
tctgacacat tcacttaatt tcaagagtaa gcaagcatga taactgaaac tattttatgcg	1560
tatcttacct tgatatttga cacattacat gacacacctc aacatcaact tcaaagatta	1620
agcgcaccac catattatct ttcttttttt ttttatgaag gttttataaa attattaaat	1680
taggtccaaa aaattgtttg tcaaataacc ttttatacta gattgatgac aaaaattacc	1740
tttacgtttt gaaagaccat ttttaagacct aatctatcag tgactcctta aagttggcac	1800
aatatttcac ttagacaccc taattgaatg atgttcattt taaacacca atgtaggggt	1860
ccgctatata attttgacac atttcttaac atcaacaaaa atatataatg agtatgtgat	1920
atactcgca atgacgtgaa aaatgaagac atttgttatt tgtatcaaag tagttactaa	1980
ataattaatt ttgaataaaa ataaaagctg accagtaa atcaataacaca taatattttc	2040
cacctaataa ttaaaatata aaataaaaaa gagccatctc agggatcatct gccaccatt	2100
gctatttcaa agaaatttgt acgttagttt atagaaattg atgttaaaat tctttcaaga	2160
aaaatttatg aatgaattta ttctctaatt taaaaatatt ttctgttatt tttgttgaaa	2220
gaaatttaac ttggataaaa tgggtggtta aactggaaag aagaaaagag aaaaaataat	2280
taaaaatcat ttcacgctct aatcaatgag cgtatcacat tcattatggt atataagcaa	2340
aagtgacaaa acgaaaataa tatattacat gaaatgtcta aaataaatat cgtctaatta	2400
aaatatctaa gtaacatatt gtgcctaact ttagagggat catcaataag ttaaacccca	2460
ttttaataac tcataattgt cctttttatt taatattgtc acaaatcaca atgataatta	2520
acattaattt gtcctttgtg acgtccatat tcatgcattt aaccaatcat cttcatttgg	2580
acttattatc acaattatcc cactttcctc acaaaatgga gcattcaagt ggaatagact	2640
acacgatttt taatttcata aaaaacatct ttttgcttta ttcattatta tattgtcgct	2700
attgttgaat tttatttgcc ctaaatttct taccataaat agatttttct ttagaaaaa	2760
ggagattgac taattctttt cttgtaggaa aaggtttagg actctataaa tagagacata	2820
ttccttctaa cttaatcaac atttacaatg tagtcttaaa gactttgaaa gtttttggtt	2880
agggggagaa attgtgggtc acaagcttga tacgttatca attgtgtaaa cctcccatgt	2940
attctgagtg aatttggttg aggttggttc cctctgtatt ttgtactctc atatttatag	3000
tggattgttc atctctttcg tggacgtagg tcgattgacc gtcgattgac cgaaccacgt	3060
taaatctttg tattttttga tatatttctc attatcttct tactcgtgat ctttcaaggt	3120

ttgcattgct atcttccgcg ttacaccaac ttattttacga tcctaacagc tatgggtgtgg	3180
aaacataaat caaacatttt actgatataa acacatcttt gattataaca tgatagaaat	3240
ttgagcccaa ctttttatca tcattatata caaaaagttc taaatttttt ttttgatgta	3300
gtaaaactta aatccatagt cttgccccta aaccaatgac ataatatata acccaaaata	3360
tactagtttt cgccctcgag ccctttaaaa agtatagtca atattttacgg tgaccgtgaa	3420
tttcttaatt atgatataa atttaaaaga aatcatgac acattctact gatgagaaca	3480
tgtgctaadc aagggaaaac atggatgtga aaaatacttt ttgttaaaag taaaaaaaaa	3540
tgtgaaattt tgtagttat ttactaccta tacattattt gagcatgtgc aaactttaca	3600
aatacctaata agaagatttt cacctgcctg tatatatgta aattaattat aatgaacact	3660
ctcacataaa ataattatca gtatatacat taatacttgc cctccacaat gaattaaata	3720
aatgtagaa catgatctac acttcaataa aactaagacc ataaagaata atttcaaaat	3780
atacacatgt caacaataaa ttatttgcac attatattaa ctactaaac aatctttact	3840
tttgaaatat aaaaataatc aagttataag tctgctcaaa gtaaagcact tgtagactc	3900
atctgatttt gagaaggtaa gcaaattgat ggtgcataat agtcacaagt aaaatataaa	3960
atagatttca ttagtaaaat tgttttttac tttctttata tataattatc aatctcttc	4020
aatggtaggt taattatatt gttaacttct tggtgaatta aagcaataag acaagaatat	4080
taaagataaa agaacaataa aaatagaaag actaagagat aagagttttc ttattcttct	4140
ttcaataagt atcatcaagt gtatacaata taaatttttg tttttttgat ctatctattt	4200
ataatgttat atataagcat acaaaagatc agtcataaat atgactttta tcatgaaaat	4260
aatgaaagag attatgaagg cgtaaggtta ctagaataat agtcattaaa aaaaggggtt	4320
atctttataa ttgaataatt gatgaagtaa tggagataat tagtgagcat aaattttttt	4380
aaaaaatgg acatttacac tataatattt tataacactt tcccttaaac atctaggtat	4440
aaataatgag tcttgtcaaa atcttagtag gaaaaattct gtgaaatttt tttagtga	4500
acaaatgata taaatatctt gaatactcat tatttgttgt ctattaaaa atcttatctg	4560
acctataaaa taaattattt gctcaactca aaatagtttt tcattctaaa attagtataa	4620
ttattagtga atatttaatt aacataattg tatactaagg ggcctataaa ttggattctt	4680
ctcaaagaaa aataaaatca ccacacaact ttcttcttct gctcatcaat tagcaattaa	4740
tccaaaacca ttatggctgc	4760

<210> 19  
 <211> 1229  
 <212> DNA  
 <213> Tomato

<220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(1229)  
 <223>

<400> 19  
 gatcttactt taccataatg gtgaaaagga tagagaccca catgggttttt acttcgttat 60  
 agagacaaga tgaaaacaaa tctaaaattt aatattatag atggatagat gatggacaac 120  
 aaaaagagaa aagaagatac tggtcattgg tccaaaacag ccacccgaat caatatatga 180  
 ccgaaaaaca aaagctacag aatcatatct gtgcaacggg gccacagtgc tataggatag 240  
 cacaaccaca ctgtcacata aaaaagagga ttttgcactc gtttttagatg gagtttcgta 300  
 attttcgggt ctttcaagct taaatatata cttcattaaa gcttcgaatt ttgtaatgtt 360  
 caattctacc tctttgatgt tcgataccta taaaataatt aaataaacgt atagacgtag 420  
 gaacaattaa gcggagttag atagtgcatt tatgattcta cctgtgagtg caatggtaaa 480  
 atggacatta taaaagagta ggggcaaaga gggaagtga aaattctccc cacttagcca 540  
 tgtttaatat agtagggata ggaatatgta ataagtagtg ttttttctat ttaattttct 600  
 gtatacttct tccatctcct ttaattatta aaagggtttc ctctctttac tctttctctc 660  
 taaattacta ttctgaagta tattttcttt tataaaaaga gtaataaact ttatttccat 720  
 taaaagaaca aacaacaaga aatgataatc aaatacacat tcatattttt aaaaaaaaag 780  
 ttaaacaaga tatagaaata gttatcaa atatttatgt tgtcattcct tgtatacaat 840  
 ggcattcctt tagctttgtt tatgtatttc ctgagcttct cttagtgtac tatatccttt 900  
 aatattaatg catctttcga tcttgctaag atatgataaa aatagacgac acgtgtcaca 960  
 acctaattga gatatttcga tgtactttct atccgtctta gcttgtaatt aattattggt 1020  
 aaaaaagaat actcaattaa ctagaaacaa gaaataagaa acgaaaacat tacaaaacgg 1080  
 agttgaagcg tgcaaatttg tggaaatgat tgttatcatg aaccagaaaa cattaaataa 1140  
 ctcttcctat aaaaggccct tattcttcac tttctcaaat cacgtcctaa agatatcaaa 1200  
 gatttcaact gatagcaaaa agcactact 1229

<210> 20

<211> 845  
 <212> DNA  
 <213> Tomate

<220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(845)  
 <223>

<400> 20  
 ctgttattga atttctataa aatgttataa tattgatttc ttaatgatca gttaactacg 60  
 tgattatttg atatgttttt aatctaaaat gtgatatgta aaatatagaa gaaaaaaaaat 120  
 taaaaagaac tttaagaaaa aaatttcaac ccacccaac ctaaaatcct aggtccgcca 180  
 tggtaattat agatatatga tgatgaaggg caaatattgg tctatgagaa ttcgggtgat 240  
 actaccgctt gaagagcaat aatgggttttg ggactccgat gagggaaaca ttcaaatatg 300  
 atggattttg gtgatactat gtttaccga gctagctatc acagaataat ctacatccca 360  
 caaatgaaat atgttatagg ctaccaatta ggaagtagtg gaattatgaa gaagtaggga 420  
 tgtgcaaata taagagaaaa ttgaaaatt atgattgaaa caagttatgt ttttttaact 480  
 agatgaatta aatggtttaa agattttag atttataatc aaacaattac cgctactcta 540  
 tcggtgacta ccaattccat cattgtaaat aacaataac agattcgttg ctggatgtct 600  
 tagtgccgtg aagcctacaa atcacactat aaactgctta gctctcgagc gttactaatt 660  
 tgggtgattac caattccaac attgcgactt cttctactag tagtactaaa atagcaagta 720  
 atatgcattt gtggttaagat gtttggtggt aacctttcct aaccagacta taaatgacct 780  
 caacactata gtggagtttc atcgatcatc attctaaacg aaaaacttga agtgaaagca 840  
 tcaag 845

<210> 21  
 <211> 3417  
 <212> DNA  
 <213> Tomate

<220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(3417)  
 <223>

<400> 21  
 aagcttggct gcaggtcgac ctgcaggtca acggatcaat gccttgtaa taatatgaaa 60  
 ataagacgta aaagaagtct tgcatatgca ccataatatt agacttatgg acaaaagtaa 120

gttggttcaa attacgcttt tatttatcca catagcaaga aaataatact caaaatccaa	180
cggtatcggt tattttatat ttactctac atgtatatat gtagtataat ggacataaat	240
tctgtcgtaa ttatacatat attaataatg aggattgtaa aataatatgc aaaaacgtcg	300
tatttgacat actaatagct aaaatactac ctactatcat atataattag ttaactatgt	360
gccttttaag aaaaattacg tgaaataaca aatatttaga gcatattatg taatatagct	420
gtagttttat tattttttgt taatggctac aatttcgcaa aattttccta tttgtttct	480
taatcgata aatccaaatt ttgtataatt atgacctaa ttgtttaatt cagatttcgt	540
ataaaattcg atttttgatt ttataaatta aaatttatac ttactttagc tacttgttta	600
tgatttatca aaaaattcat attaacttat ttgtatatgg acaagcaaaa tatacaaatg	660
gagttctgaa aattttctaaa tgcataact taatatcttt gatggtcact caactatcaa	720
ctttttccat aaaaagtcac ttaacattga ttttcaactc gaaaatcact caactatgaa	780
atctttgtat agaaagtcac tcaacctatt taattatfff ttccattat atctgttgtc	840
acgaaatatt atttctaact aatattctaa gaataaacat acatccattt aaatcattta	900
ataaaccgcg ccacttgacc taaccacat aatattaaca cttttgtttt acttttattc	960
tccaaaatta ttttcttggt ttccattct ttctccttg cttttttttt cttcttctca	1020
atttcagcct ttttcttct ttttttagta aacctcagtc aaataggaat tagattgtga	1080
ttaaaatatt attagaagga tgcaggggtg tacaaagaga gtttattaag agataatcta	1140
taaaaaaaaa aaagtcagat aatgcatatt cagattcaga gatcattaaa tgatgacttt	1200
tttcgtaata ggttttcttt aaatcctttc gccttcatac gacgactctc gataataaca	1260
tcgtttaaag ctaataatgc taatgaacaa taatcaaaat aaaaaagaat tcggatacaa	1320
gagaaaatga tttagtgaga gaaaaaattg agatattcct tattcctaac taaacgaagg	1380
aagaagaggc taaaattgag attcagttaa aaaaaaaaaa caaagaaaaa cgcaatggag	1440
atgagagaaa gtaattttga aaaataaaaa taaattaaga gggtaaataat tttattttta	1500
gcgagttggg ttaagtgggt cgggtcatta aatggatata tgtttatttc ttaaaatttt	1560
agttagaaat acaaatttca aatcaacaaa ttttaatgaa aaaataatta aatagggtga	1620
gtggctttct atgcaaagat ctcatagttg agtgattttt gagtagaaaa tcatagttaa	1680
gtgagtttct gtgaaaaaaaa attgatagtt gagtgactat caaagatatt aactctagac	1740
ttgtcatatt cgtatactta catacgaaat atacaaacct ctgcctccat gacaagcaaa	1800



aaactataac tatgaaacaa tatttttcgaa atcatagcta taaagtctta ttatatctaa	1860
tatcttttact attttttaaaa atttcacata attttaatac ataaataatt tactttttaac	1920
taacgaaaaa ggacattttt atgtcacctg agagcccatc ggtagattca tcacattttt	1980
tcgttttcttg taataaactg tacacatata aggagaaatt aaattagaga ttattttttcc	2040
attttgagga gattaataaaa tttaaaatgt aacttaacat gtaaactgct ataaaggtaa	2100
caaaacacgt aaactgctat aaaggtaatt ctatttaaaa gataaataaa tgcttaaaaag	2160
aagtgccaaa aaaacacaaa caaacaatg aaactaaacc tacttcaagg gaagttcttg	2220
tagtataaaa ataaataaag tcaacttatt cacgacattt ctttttggtt ttcttttggc	2280
tacgtattca tatttaagtc tgactaattt agattctcgc tatatataaa agattcaggg	2340
gtggctcaac gcaattggag gcctagagca aaatttcaat tcgcggccta atatattata	2400
tactttatat acctatttat tcaaaattta ttttttttac actatttaga tggaaattat	2460
tagtacttaa tattgttttt tcagttatta gttttaggta aaattttatt aatacaacat	2520
tgaaaaacat cctttaagtg agacaattat tatatgtatt gttaacatag tgctataagt	2580
aataagtaaa taaatattaa ataaaaataa gagtaagaac catagaattt gacacaagaa	2640
gttgatgact tgggtatacct cattttaaca tgcttgact ttagtaatgc ttgaatctaa	2700
aatttaaaaa gaaataaaaa agaatttgta atccactttt tccaacactt ttcactgtta	2760
attcttattt ttaacatagt acaaaaaata ttaaaatgga taaaataatt tattttataa	2820
aagattatat atatattttt ttatcatata taactaattt ttctataaaa atttaaacac	2880
ataatttaat tttaaaaaaa atttggggct ttggggccta agacaaaggc cttaaaggac	2940
aaaacataga gccgcccctg aaaagatctc attcgaaaga aaatatgcat taccaatgat	3000
ttttcgtagc cagagctcaa aatcaaaatt gtactgttat ttttttaaaa aatttcactt	3060
cagactaaat ggaatttttt tctttgggta acctgtttga tcaatctttt ggaatcagtt	3120
aattttgaaa aataaattaa tgagaaataa tttgtatttg tccagcttat ttaagaatta	3180
tttttgagca acaatttata tttagtcacg cttttaagtg tattttttta aataaaatta	3240
aggtattatt tgaaaaaatt acttttaaaa aaattgaatt aaattctgtt actcttatta	3300
tatactccta tataatttga ttgccaaaaa tatcaaactg ttaatatttg aagttgatgt	3360
gagggattac ttcttgatta aattgtacta caatgtaata ttatcaaatt aaagctt	3417

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 1155

<212> DNA  
 <213> Haematococcus pluvialis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (6)..(995)  
 <223>

<400> 22  
 gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98  
 Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp  
 20 25 30

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146  
 Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser  
 35 40 45

gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc 194  
 Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser  
 50 55 60

gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc 242  
 Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala  
 65 70 75

gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg 290  
 Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu  
 80 85 90 95

gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt 338  
 Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val  
 100 105 110

agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg 386  
 Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu  
 115 120 125

gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat 434  
 Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His  
 130 135 140

ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga 482  
 Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg  
 145 150 155

gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc 530  
 Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg  
 160 165 170 175

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578  
 Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro  
 180 185 190

gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc 626  
Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe  
195 200 205

atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674  
Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp  
210 215 220

acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722  
Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val  
225 230 235

ttc	atg	gcg	gcc	gcg	ccc	atc	ctg	tcc	gcc	ttc	cgc	ttg	ttc	tac	ttt	770
Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe	
240					245					250					255	

ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818  
Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser  
260 265 270

tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tgc cgc act agc cag gcg tcc 866  
Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser  
275 280 285

gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914  
Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu  
290 295 300

cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962  
 His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg  
 305 310 315

cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc 1015  
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
320 325

cctgctgcca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc 1075

gctgctgccg gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg 1135

tttgtagctg tcgagcttgc 1155

<210> 23

**<211> 329**

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 23

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
20 25 30

DE 102 38 978 A1 2004.03.04

Leu	Arg	Thr	Trp	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Ser	Asp
		35					40					45			
Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp
		50				55					60				
Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala	Ala
65					70					75					80
Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	Asp
				85					90					95	
Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Ser
			100					105					110		
Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	Glu
		115					120					125			
Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	Gly
	130					135					140				
Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	Val
145					150					155					160
Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	Lys
				165					170					175	
His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Asp
			180					185					190		
Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	Met
		195					200					205			
Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp	Thr
	210					215					220				
Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Phe
225					230					235					240
Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly
				245					250					255	

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
325

<210> 24  
<211> 1111  
<212> DNA  
<213> Haematococcus pluvialis

<220>  
<221> CDS  
<222> (4)..(951)  
<223>

<400> 24  
tgc atg cta gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc 48  
Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser  
1 5 10 15  
tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa 96  
Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu  
20 25 30  
gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca 144  
Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro  
35 40 45  
cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc 192  
Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser  
50 55 60  
tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc 240  
Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr  
65 70 75  
tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag 288  
Ser Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln  
80 85 90 95

ctg gtt agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt Leu Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe 100 105 110	336
gtc ctg gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala 115 120 125	384
atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg Met His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu 130 135 140	432
ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu 145 150 155	480
cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys 160 165 170 175	528
gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala 180 185 190	576
agc ttc atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala 195 200 205	624
tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu 210 215 220	672
ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe 225 230 235	720
tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser 240 245 250 255	768
ggc tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag Gly Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln 260 265 270	816
gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His 275 280 285	864
tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn 290 295 300	912
tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala 305 310 315	961
tgacgtgggc cctgctgcca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa	1021

agctgcaggc gctgctgccg gacacgttgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta 1081

ggggaggggg tttgtagctg tcgagcttgc 1111

<210> 25

<211> 315

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 25

Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser  
1 5 10 15

Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu  
20 25 30

Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro  
35 40 45

Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp  
50 55 60

Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser  
65 70 75 80

Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu  
85 90 95

Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val  
100 105 110

Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met  
115 120 125

His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly  
130 135 140

Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His  
145 150 155 160

Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp  
165 170 175

Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser  
 180 185 190

Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp  
 195 200 205

Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu  
 210 215 220

Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr  
 225 230 235 240

Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly  
 245 250 255

Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala  
 260 265 270

Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
 275 280 285

Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys  
 290 295 300

Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 305 310 315

<210> 26  
 <211> 1031  
 <212> DNA  
 <213> Haematococcus pluvialis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (6)..(1031)  
 <223>

<400> 26  
 gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98  
 Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp  
 20 25 30

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146



Val	Leu	Arg	Thr	Trp	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Ser		
			35					40					45				
gac	gcg	gcc	cgc	ccg	gga	ctg	aag	aat	gcc	tac	aag	cca	cca	cct	tcc		194
Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser		
		50					55					60					
gac	aca	aag	ggc	atc	aca	atg	gcg	cta	gct	gtc	atc	ggc	tcc	tgg	gct		242
Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala		
	65					70					75						
gca	gtg	ttc	ctc	cac	gcc	att	ttt	caa	atc	aag	ctt	ccg	acc	tcc	ttg		290
Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu		
80					85					90					95		
gac	cag	ctg	cac	tgg	ctg	ccc	gtg	tca	gat	gcc	aca	gct	cag	ctg	gtt		338
Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val		
				100					105					110			
agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg		386
Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu		
			115					120					125				
gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	atc	acc	acg	cat	gat	gct	atg	cat		434
Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His		
	130						135					140					
ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga		482
Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg		
	145					150					155						
gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc		530
Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg		
160					165				170						175		
aag	cat	tgg	gag	cac	cac	aac	cac	act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	gac	cct		578
Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro		
				180					185					190			
gac	ttc	cac	agg	gga	aac	cct	ggc	att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	agc	ttc		626
Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe		
			195					200					205				
atg	tcc	agc	tac	atg	tcg	atg	tgg	cag	ttt	gcg	cgc	ctc	gca	tgg	tgg		674
Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp		
		210					215					220					
acg	gtg	gtc	atg	cag	ctg	ctg	ggt	gcg	cca	atg	gcg	aac	ctg	ctg	gtg		722
Thr	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Val		
	225					230					235						
ttc	atg	gcg	gcc	gcg	ccc	atc	ctg	tcc	gcc	ttc	cgc	ttg	ttc	tac	ttt		770
Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe		
240					245					250					255		
ggc	acg	tac	atg	ccc	cac	aag	cct	gag	cct	ggc	gcc	gcg	tca	ggc	tct		818
Gly	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser		

260	265	270	
tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc			866
Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser			
275	280	285	
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag			914
Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu			
290	295	300	
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc			962
His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg			
305	310	315	
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca			1010
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser			
320	325	330	335
gaa gag gat ctg aat agc tag			1031
Glu Glu Asp Leu Asn Ser			
340			

<210> 27  
 <211> 341  
 <212> PRT  
 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 27

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala		
1	5	10 15
Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val		
20	25	30
Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp		
35	40	45
Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp		
50	55	60
Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala		
65	70	75 80
Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp		
85	90	95
Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser		
100	105	110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
 325 330 335

Glu Asp Leu Asn Ser  
340

<210> 28  
<211> 777  
<212> DNA  
<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(777)  
<223>

<400> 28  
gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60  
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactgggtcga 120  
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180  
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tctaacttg tgattccttc ttaaacccta 240  
ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaggc aaatccggga aattattgta 300  
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360  
tatatatctc tttcttctta tttcccaaat taacagacaa aagtagaata ttggctttta 420  
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgcga 480  
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt 540  
ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta 600  
tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt 660  
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact 720  
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaata tcttcaacaa aaagctt 777

<210> 29  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> *kuenstlich*

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(22)  
<223>

<400> 29  
gcaagctcga cagctacaaa cc 22

<210> 30  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> kuenstlich

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(24)  
<223>

<400> 30  
gaagcatgca gctagcagcg acag

24

<210> 31  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> kuenstlich

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(30)  
<223>

<400> 31  
tgcattgctag aggcaactcaa ggagaaggag

30

<210> 32  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> kuenstlich

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(59)  
<223>

<400> 32  
ctagctattc agatcctctt ctgagatgag tttttgctcg gcaggaacca gacctcggc

59

<210> 33  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstlich

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 33  
gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 34  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> kuenstlich

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(37)  
<223>

<400> 34  
cgccgttaag tccgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 35  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> kuenstlich

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(34)  
<223>

<400> 35  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 36  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> kuenstlich

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(25)  
<223>

<400> 36  
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweisen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Früchten eine Ketolase exprimieren.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Früchten mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, in die man ausgehend von einer Ausgangspflanze mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, eingebracht hat.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO. 1 einbringt.
7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO. 15 einbringt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promotors erfolgt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze verwendet, die in Früchten Chromoplasten aufweist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze ausgewählt aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Lathyrus, Lonice-  
ra, Luffa, Lycium, Lycopersicum, Malpighia, Mangifera, Mormodica, Murraya, Musa, Nenga, Palisota, Panda-  
nus, Passiflora, Persea, Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sa-  
bal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Synspadix, Tabernae, Tamus, Taxus, Trichosan-  
thes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vignia oder Vitis verwendet.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivie-  
ren die genetisch veränderten Pflanzen erntet und anschließend die Ketocarotinoide aus den Früchten der  
Pflanzen isoliert.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarotinoide aus-  
gewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechi-  
nenon, Adonirubin und Adonixanthin.
15. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen fruchtspezifischen Promotor und eine  
Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.
16. Genetisch veränderte Pflanze, die in Früchten eine Ketolase-Aktivität aufweist.
17. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch verän-  
derte Pflanze in den Früchten eine Ketolase exprimiert.
18. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 16 oder 17, enthaltend in Früchten mindestens eine Nu-  
kleinsäure, kodierend eine Ketolase.
19. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet dass

man in die Pflanze ausgehend von einer Ausgangspflanze mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, eingebracht hat.

20. Genetisch veränderte Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Actinophloeus, Aglaeonema, Ananas, Arbutus, Archontophoenix, Area, Aronia, Asparagus, Attalea, Berberis, Bixia, Brachychilum, Bryonia, Caliptocalix, Capsicum, Carica, Celastrus, Citrullus, Citrus, Convallaria, Cotoneaster, Crataegus, Cucumis, Cucurbita, Cuscuta, Cycas, Cyphomandra, Dioscorea, Diospyrus, Dura, Elaeagnus, Elaeis, Erythroxylon, Euonymus, Ficus, Fortunella, Fragaria, Gardinia, Gonocaryum, Gossypium, Guava, Guilielma, Hibiscus, Hippophaea, Iris, Lathyrus, Lonicera, Luffa, Lycium, Lycopersicum, Malpighia, Mangifera, Mormodica, Murraya, Musa, Nenga, Palisota, Pandanus, Passiflora, Persea, Physalis, Prunus, Ptychandra, Punica, Pyracantha, Pyrus, Ribes, Rosa, Rubus, Sabal, Sambucus, Seaforita, Shepherdia, Solanum, Sorbus, Synaspadix, Tabernae, Tamus, Taxus, Trichosanthes, Triphasia, Vaccinium, Viburnum, Vignia oder Vitis, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

21. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketolase in Früchten exprimiert wird.

22. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 16 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionsrate einer Ketolase in Früchten am höchsten ist.

23. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 16 bis 22 als Futter- oder Nahrungsmittel.

24. Verwendung der Früchte der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 17 bis 23 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- oder Nahrungsergänzungsmitteln.

25. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen fruchtspezifischen Promotor und Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in das Genom der Ausgangspflanze einführt.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen



Abbildung 1: Biosyntheschema von Carotinoiden in Tomatenfrüchten

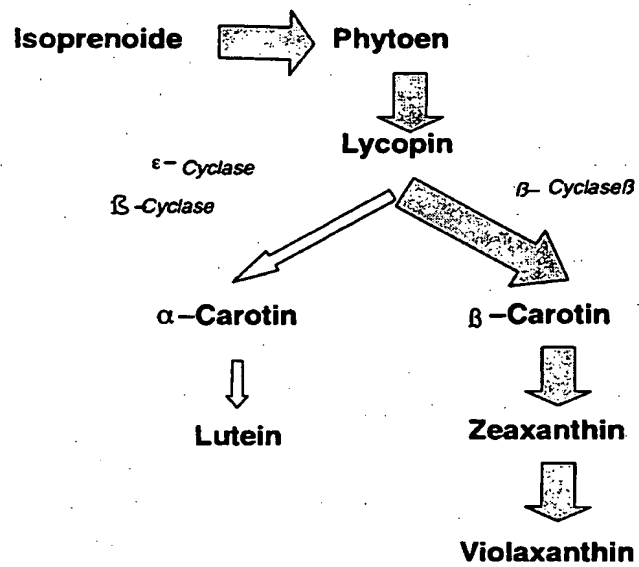
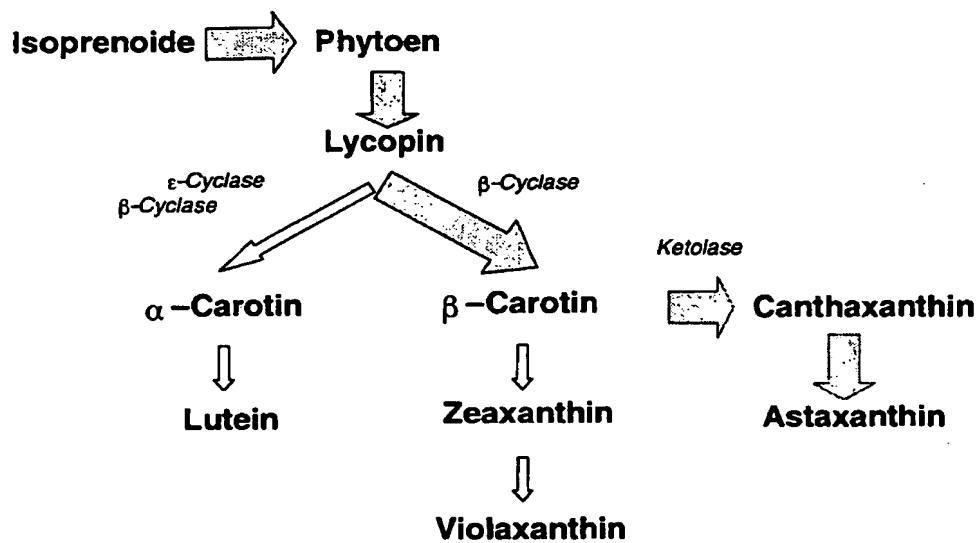


Abbildung 2: Biosyntheschema von Astaxanthin in genetisch veränderten Tomatenfrüchten



## Abbildung 3: Nukleotidsequenzvergleich

```

KETO2.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGCCCTGAGCCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTCCAGCCAGCTCTGACGTGTTCC 100
X86782.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGCCCTGAGCCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTCCAGCCAGCTCTGACGTGTTCC 100

KETO2.seq GTACATGGGCGAAGCCAGTACTGCTTCCGTGAGAGAGTCAAGCGGGGGGGGGGGGAGTGAAGAATGCTACAAGCCAGCAGCTTCCGACACAAAGGG 200
X86782.seq GTACATGGGCGAAGCCAGTACTGCTTCCGTGAGAGAGTCAAGCGGGGGGGGGGGGAGTGAAGAATGCTACAAGCCAGCAGCTTCCGACACAAAGGG 200

KETO2.seq CATCACAATGGGCTAGCTGTGTCATGGCTCTGCGGCGCAGTGTCTCCAGCCATTTTCAATCAAGCTTCCGAGCTCTTGGAGCAGCTCCACTGG 300
X86782.seq CATCACAATGGGCTAGCTGTGTCATGGCTCTGCGGCGCAGTGTCTCCAGCCATTTTCAATCAAGCTTCCGAGCTCTTGGAGCAGCTCCACTGG 300

KETO2.seq CTGCGCGTGTGAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTACCGGCAAGCAGCAGCTCTCCACATGGTGGTAGTATTCTTTGTCTGGAGTTCCTGTACACAGGCC 400
X86782.seq CTGCGCGTGTGAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTACCGGCAAGCAGCAGCTCTCCACATGGTGGTAGTATTCTTTGTCTGGAGTTCCTGTACACAGGCC 400

KETO2.seq TTTTATCAACAGCAGTATGCTATGCTATGGCAGCATGGCATGAGAAACAGCCAGCTTAATGACTTCTTGGGAGAGTATGCAATCTCTTGTAGCCCTG 500
X86782.seq TTTTATCAACAGCAGTATGCTATGCTATGGCAGCATGGCATGAGAAACAGCCAGCTTAATGACTTCTTGGGAGAGTATGCAATCTCTTGTAGCCCTG 500

KETO2.seq GTTTGATTACAACATGCTGCACCGCAAGCATTGGGAGCAGCACAACCACTGGGAGGTTGGGCAAGGAGCCTGACTTCCACAGGGGAAAGCCTGGCATT 600
X86782.seq GTTTGATTACAACATGCTGCACCGCAAGCATTGGGAGCAGCACAACCACTGGGAGGTTGGGCAAGGAGCCTGACTTCCACAGGGGAAAGCCTGGCATT 600

KETO2.seq GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTCAATGTCCAGCTACATGTGGATGTGGCAGTTTGGGCGCTGGCATGGTGGAGGGTGGTCAATGCAGCTGCTGGGTGGGCAA 700
X86782.seq GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTCAATGTCCAGCTACATGTGGATGTGGCAGTTTGGGCGCTGGCATGGTGGAGGGTGGTCAATGCAGCTGCTGGGTGGGCAA 700

KETO2.seq TGGCGAAGCTGCTGGTGTTCATGGGCGGGGGGGGCAATGCTGTGGGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGGTACATGGGCGACAAGCCTGAGCCTGGGGC 800
X86782.seq TGGCGAAGCTGCTGGTGTTCATGGGCGGGGGGGGCAATGCTGTGGGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGGTACATGGGCGACAAGCCTGAGCCTGGGGC 800

KETO2.seq CCGGTACGGCTCTTCAACAGCGGTCATGAAGTGGTGGAGTGGGCACTAGCCAGCGGTGGAGCTGGTCAGCTTTCTGAGCTCTTACCACCTTGGAGCTG 900
X86782.seq CCGGTACGGCTCTTCAACAGCGGTCATGAAGTGGTGGAGTGGGCACTAGCCAGCGGTGGAGCTGGTCAGCTTTCTGAGCTCTTACCACCTTGGAGCTG 900

KETO2.seq CACTGGAGCAGCAGCGCTGGGCTTTGGGCGCTGGTGGGAGCTGGGCACTGGGCGGGCTGTCTGGGAGGTCGGTTCCTGCTAG 990
X86782.seq CACTGGAGCAGCAGCGCTGGGCTTTGGGCGCTGGTGGGAGCTGGGCACTGGGCGGGCTGTCTGGGAGGTCGGTTCCTGCTAG 990

```

Abbildung 4: Proteinsequenzvergleich

KETO2.pro	MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA	50
X86782.pro	MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA	50
KETO2.pro	RPGLKNAYKPPPSDTKGITMALAVIGSWAAVFLHAI FQIKLPTS L DQLHW	100
X86782.pro	RPGLKNAYKPPPSDTKGITMALRVIGSWAAVFLHAI FQIKLPTS L DQLHW	100
KETO2.pro	LPVSDATAQLVSGSSSLLHI VVVFFVLEFLYTGLFITTHDAMHG TI AMRN	150
X86782.pro	LPVSDATAQLVSGTSSLLDI VVVFFVLEFLYTGLFITTHDAMHG TI AMRN	150
KETO2.pro	RQLNDFLGRVCI SLYAWFDYNMLHRKHWEHHNHTGEVGKDPDFHRGNP GI	200
X86782.pro	RQLNDFLGRVCI SLYAWFDYNMLHRKHWEHHNHTGEVGKDPDFHRGNP GI	200
KETO2.pro	VPWFASFMS SYMS MWQFARLA WWT VVMQLLGAPMANLLVFMAA API LSAF	250
X86782.pro	VPWFASFMS SYMS MWQFARLA WWT VVMQLLGAPMANLLVFMAA API LSAF	250
KETO2.pro	RLFYFGTYMPHKPEPGAASGSSPAVMNWWKSRTSQASDLVSFLT CYHF DL	300
X86782.pro	RLFYFGTYMPHKPEPGAASGSSPAVMNWWKSRTSQASDLVSFLT CYHF DL	300
KETO2.pro	HWEHHRWPFAPWWELPNCRRLSGRGLVPA	329
X86782.pro	HWEHHRWPFAPWWELPNCRRLSGRGLVPA	329

Abbildung 5: Konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Tomatentransformationskonstrukt)

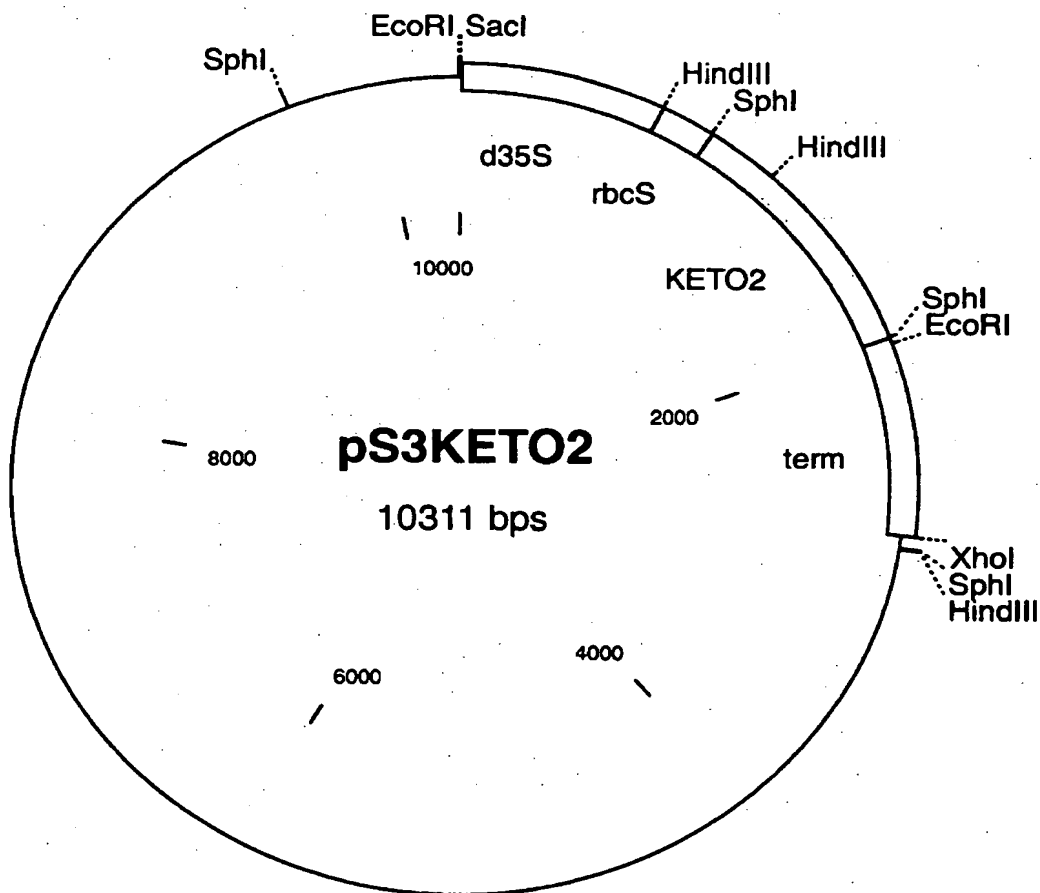


Abbildung 6: Konstrukt zur Überexpression des N-terminal verkürzten Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters.

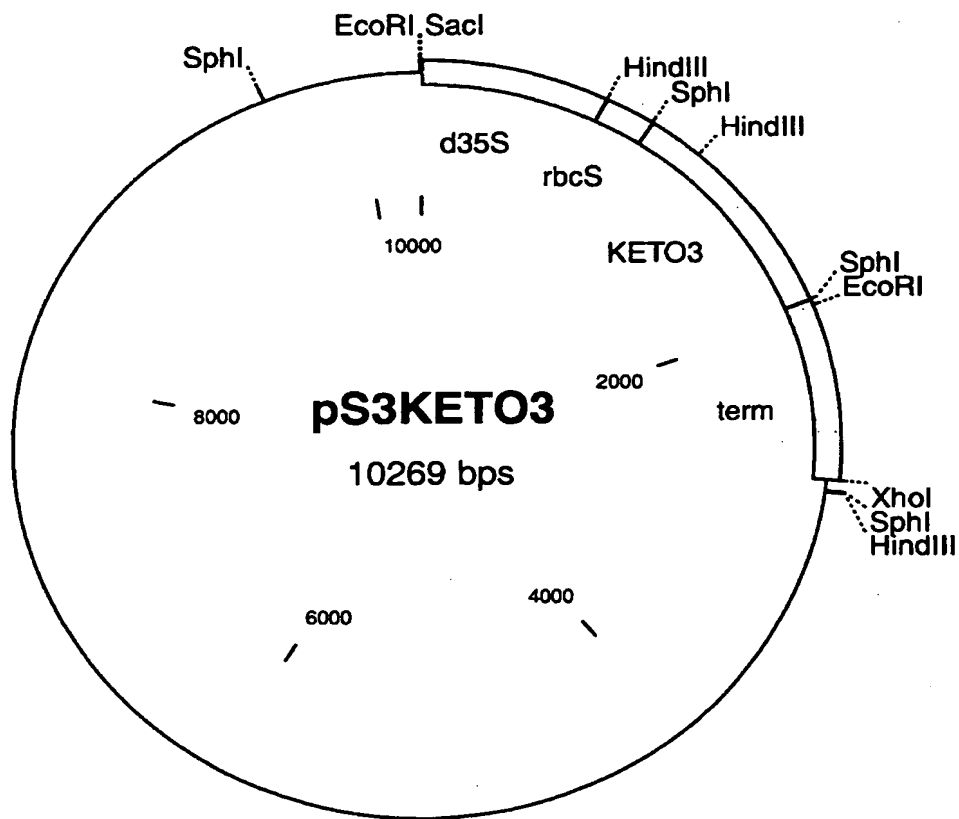


Abbildung 7: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse und C-terminalem myc-Tag unter Kontrolle des d35S-Promoters.

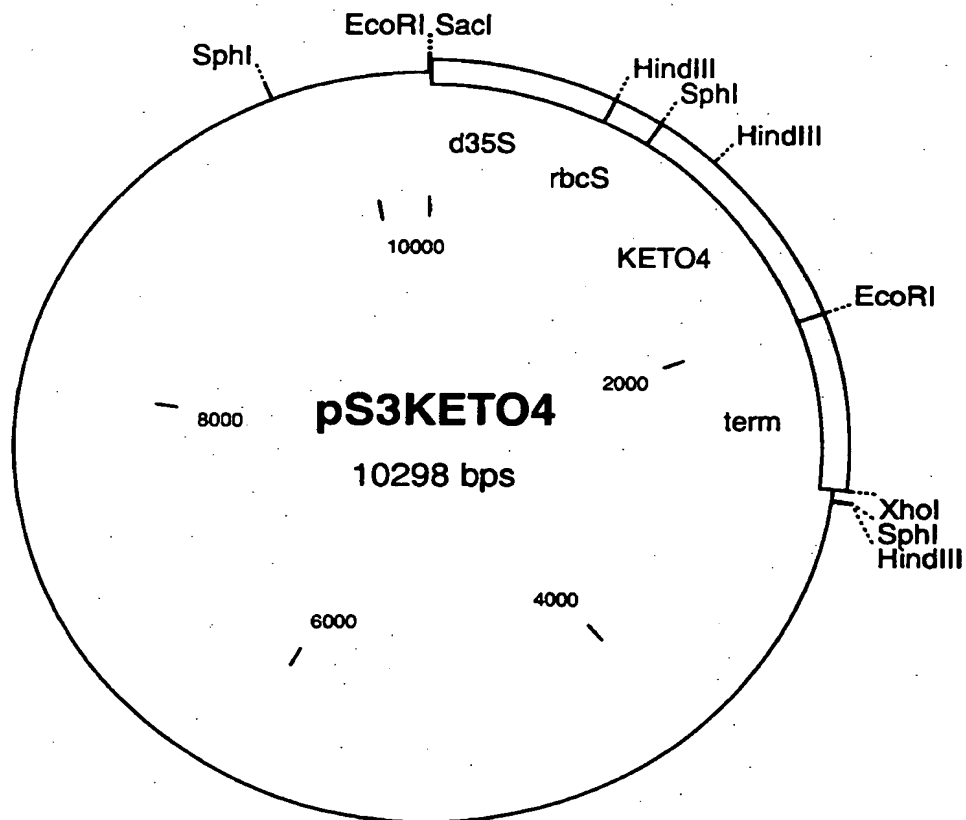


Abbildung 8: Konstrukt zur Überexpression der  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tomatentransformationskonstrukt).

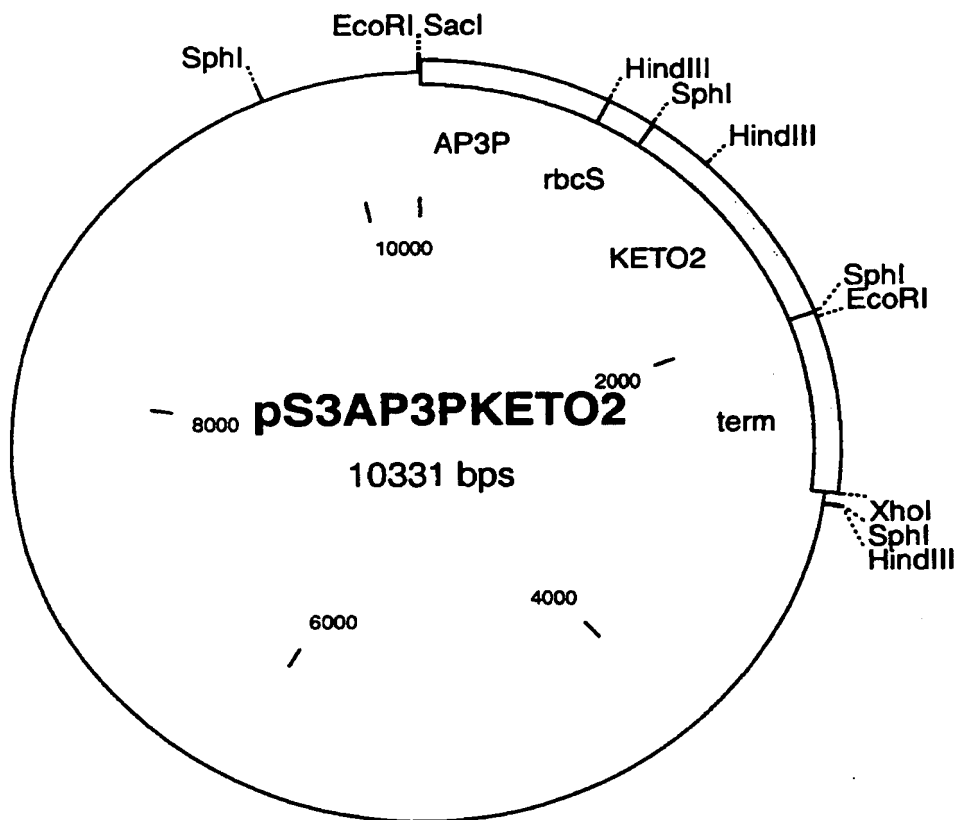
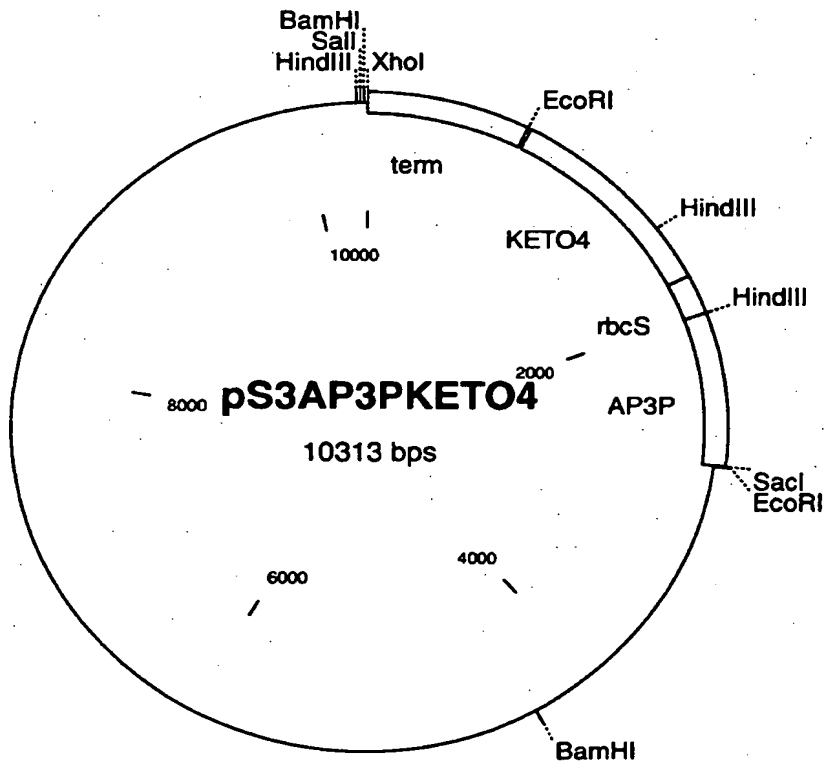




Abbildung 9: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse und C-terminalem myc-Tag unter Kontrolle des AP3P-Promoters.



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**